



UNIVERZITA KARLOVA  
Přírodovědecká fakulta

## OPONENTSKÝ POSUDEK DIPLOMOVÉ PRÁCE

Název práce:

**Regulace tvorby kostní tkáně pomocí osteogenních suplementů v modelu osteoporózy**

Student: Bc. Eliška Krčmářová

Vedoucí práce: Mgr. Eva Filová, Ph.D.

Oponent: Mgr. Zdeněk Zadražil, Ph.D.

Diplomová práce Bc. Elišky Krčmářové pojednává o regulaci tvorby kostní tkáně v modelu osteoporózy, s hlavním cílem navrhnout *in vitro* model pro studium tohoto onemocnění

### Úvod

Na 17 stranách studentka pojednává o kosti a kostních buňkách, remodelaci kosti, osteoklastogenezi, či různých *in vitro* modelech používaných pro studium kostní remodelace. Tato část je poměrně zdařilá, je jasně členěna a předkládá dostatečné informace pro pochopení problematiky.

### Materiál a metody

Ve svém diplomovém projektu studentka zvládla škálu metodik práce s buněčnými kulturami. K vizualizaci pak používala fluorescenční mikroskopie a světelné mikroskopie.

Pro vytvoření ko-kultury byly použity osteoblasty z femuru potkanů a monocyty/makrofágy z periferní krve, v metodice ale není jasně uvedeno, že studentka monocyty/makrofágy přímo neizolovala, a tak byly v ko-kulturách i další buněčné typy (tento fakt je ale správně diskutován v sekci diskuse).

Při rozmrazování buněk studentka neuvádí míru přežívání. Osteoporóza byla u OVX samic ověřována měřením estradiolu, osteokalcinu a  $\beta$ -crosslapsu, tato měření přinesla nejednoznačné výsledky. Proto byla osteoporóza prokázána pomocí microCT, tato data ale nejsou bohužel ukázána. Také není zřejmé, zda byla microCT provedena u všech samic použitých v experimentech.

## Výsledky

Studentka vyprodukovala velké množství výsledků, tato sekce je ale v diplomové práci poměrně nepřehledná. Pro vizualizaci dat studentka používá pouze sloupcové grafy, pravděpodobně vytvořené v MS Excel, zde bych do budoucna navrhol použít některý z výrazně kvalitnějších programů pro vizualizaci. Studentka taky používá nestandardní zobrazování statisticky významných rozdílů, tento způsob není příliš přehledný.

Alespoň u některých grafů bych ocenil zobrazení jednotlivých hodnot. Z legendy grafů je pak často nejasné, zda jsou v grafech zobrazovány hodnoty opakování, kolik opakování bylo atd. V sekci metody studentka sice zmiňuje: „Hodnoty v grafech jsou průměrem 4-5 paralelních jamek/skupin“, ale z legend jednotlivých grafů pak toto vyčíst nelze.

Toto je pak zásadní například v grafu č.4, standardní odchylka je zde výrazná, studentka ale nediskutuje proč.

Podobný problém je dále v grafu č.8., a právě v grafu s velkou směrodatnou odchylkou by bylo lepší ukázat jednotlivé hodnoty měření, které studentka provedla. Jak si vysvětluje markantní rozdíl v obou měřeních, jde pouze o technickou chybu? Velká směrodatná odchylka je potom pouze částečně diskutována v diskusi, graf č.8 přitom zobrazuje jedno z klíčových měření pro stanovení ovlivnění osteoklastogeneze „poolováním“ PBMCs.

Nikde v textu také nejsou uvedeny konkrétní hodnoty jednotlivých měření.

Problémem jsou potom obrázky z fluorescenční mikroskopie. V diplomové práci jsou tyto obrázky v nedostatečném rozlišení a lze špatně vidět, co chce studentka ukázat. V žádném z obrázků nejsou zobrazeny jednotlivé fluorescenční kanály zvlášť, pouze jejich překryv. Ve většině obrázků jsme tak odkázáni na přítomnost, cituji, „černých děr“, které představují osteoklasty. V metodách je ale správně ukázán detail osteoklastu v kultuře, kde je daná buňka jasně rozlišena.

Mikroskopie byla také použita pro určení míry osteoklastogeneze. Studentka ale nikde neuvádí kvantifikaci počtu, či velikosti buněk ze svých kultur. Velikost, počet buněk a více-jadernost přitom studentka například používá k závěrům ze zkoumání vlivu PGE2 s MC-CSF a RANKL (například obrázek č.10), nebo se dostává i k nejasným tvrzením jako je „zřetelný trend zvýšené osteoklastogeneze v ko-kulturách s buňkami OVX jedinců.“ u obrázků č.13 a 14.

V neposlední řadě, v mikroskopických obrázcích studentka označuje jednotlivé buňky pomocí bílých šipek, které nejsou v některých obrázcích skoro zřetelné, například hned v obrázku č.5, kde studentka ukazuje TRAP barvení a barvení jader hematoxylinem, nebo působí velmi rušivě a nepřehledně (obrázek č.10) a nejsou zde úplně jasná kritéria, na základě kterých jsou některé buňky označeny a některé ne.

## Diskuse

Tuto část hodnotím jako zdařilou, studentka vyčerpávajícím způsobem diskutuje své výsledky, a porovnává je s jinými studiemi. Některé části jsou lehce nepřehledné, ale to v celkovém dojmu neubírá na kvalitě této kapitoly

## Závěr

Studentka v této části vyjmenovává výsledky svého projektu. Ty nejsou ale zpětně propojeny se stanovenými cíli, kde by bylo jasně řečeno, které části byly, nebo nebyly naplněny.

## Literární přehled

V práci je celkem 119 citací, z čehož více než polovina, 67, je starších 10 let. V některých částech citace chybí, například hned na straně úvodu:

„Ročně je nahrazeno přibližně 10 % celkového obsahu kostí“, nebo,

„Mezinárodní nadace pro osteoporózu udává, že u 1 ze 3 žen a 1 z 5 mužů starších 50 let, dochází ke zlomenině kosti právě v důsledku osteoporózy.“

V některých částech by potom bylo záhodno citovat primární práce, nikoliv review, například strana 14 „Mechanické zatížení osteocytů vede k produkci faktorů [...] Apoptóza osteocytů je dalším faktorem, který má na osteoklasty chemotaktický účinek [...] důležitým zdrojem RANKL a jsou proto někdy považovány za hlavní modulátory kostní remodelace“,

nebo strana 16, „V séru se vyskytují 2 isoformy [...] Tento enzym má fosfatázovou aktivitu a je schopen generovat kyslíkové radikály v přítomnosti peroxidu vodíku a zabíjí tak bakterie účinněji, než samotný peroxid vodíku“

## Celkové hodnocení

Samotná diplomová práce trpí některými nedostatky. Ty nacházím hlavně v kapitole výsledky. Celá kapitola je poměrně nepřehledná. Studentka nikde neuvádí přesné hodnoty svých měření, ze sloupcových grafů nejsme potom schopni jednotlivé hodnoty odečíst. Obrázky z fluorescenční mikroskopie jsou v nedostatečném rozlišení, nejsou zvlášť zobrazeny jednotlivé fluorescenční kanály a není použita žádná kvantifikace, ač právě pozorované změny fluorescenční mikroskopie mají být v některých případech průkazné pro změny v buněčných kulturách. Vyzdvihuji ale kapitolu diskuse, kde studentka správně a vyčerpávajícím způsobem diskutuje svá pozorování a porovnává je s dostupnou literaturou. Studentka jasně prokázala své schopnosti v laboratoři a při svém projektu odvedla značný kus práce.

Diplomovou práci navrhuji k přijetí a jako podklad pro udělení titulu Magister.

## Otázky:

- 1) Studentka v diskusi správně zmiňuje vliv věku zvířete na tvorbu osteoklastů. Buňky ze zdravých samic byly odebrány ve věku 3 měsíce, buňky z OVX samic ve výrazně vyšším věku 12 měsíců. Jaké další změny související s chronologickým stárnutím, či stárnutím imunitního systému, měly vliv na výsledky experimentů s OVX samicemi?
- 2) Studentka se snažila zjistit vliv „poolování“ buněk na osteoklastogenezi. Studentka vylučuje vliv alogenní reakce na osteoklastogenezi. Docházelo k alogenní reakci? A lze z určitostí tvrdit, že „poolování“ buněk nepředstavuje žádnou, nebo jen marginální limitaci?
- 3) V grafu č.16, 1. a 7. den studentka pozorovala vyšší aktivitu ALP u osteoblastů izolovaných z OVX jedinců, v ko-kultuře osteoblastů a PBMC z OVX jedinců, či monokultury z OVX. V den 14. je ale vidět zvýšení produkce ALP ko-kultury ze zdravých jedinců. Toto pozorování není diskutováno. Jak si ho tedy studentka vysvětluje?
- 4) Studentka často zmiňuje pojem „interindividuální rozdíly“. Které všechny rozdíly, hlavně s ohledem na imunitní buňky, má studentka na mysli?
- 5) Jak si studentka vysvětluje naměření nižších hodnot ALP v 14.den ko-kultivace ve skupinách, kde docházelo k osteoklastogenezi, při přidání jak PGE2, tak i  $1\alpha,24$ -dihydroxyvitaminu D3 (grafy č.13 a 21)?
- 6) V závěru studentka zmiňuje, že vzniklý model lze použít v tkáňovém inženýrství, nebo pro testování anti-resorpčních léčiv. Dokázala by studentka toto tvrzení rozvést? Jak by bylo případně nutné vzniklý model dále optimalizovat, kromě toho, co studentka zmiňuje jako „možnosti dalšího rozšíření“ vzniklého modelu?